

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-230629

⑬ Int.Cl.⁴
A 61 K 31/16
// C 07 C 103/50

識別記号
ABD

庁内整理番号
7330-4C

⑭ 公開 昭和63年(1988)9月27日

審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 自己免疫疾患予防治療剤

⑯ 特 願 昭62-62689

⑰ 出 願 昭62(1987)3月19日

⑱ 発 明 者 青 柳 高 明 神奈川県藤沢市本鶴沼3丁目3番6号
⑲ 発 明 者 田 平 武 東京都小平市小川東町4-1-1 I-201
⑲ 発 明 者 竹 内 富 雄 東京都品川区東五反田5丁目1番11号
⑳ 出 願 人 財団法人 微生物化学 東京都品川区上大崎3丁目14番23号
研究会
㉑ 代 理 人 弁理士 八木田 茂 外2名

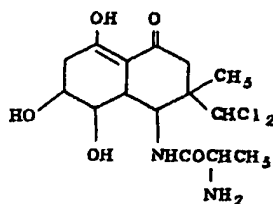
明 細 書

1. 発明の名称

自己免疫疾患予防治療剤

2. 特許請求の範囲

次式



で示されるバクトボリンを有効成分とする自己免疫疾患予防治療剤。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は新規な自己免疫疾患予防治療剤に関する。

〔従来の技術〕

自己免疫疾患予防治療剤としては、従来、抗リンパ球免疫グロブリン、グルコルチコイド類、

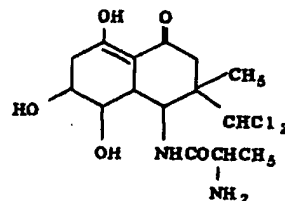
核糖体菌拮抗剤あるいはアルカル化剤などが知られている。

〔発明が解決しようとする問題点〕

前記した既存の自己免疫疾患予防治療剤には、有効性および毒性の面で不満足なものが多く、より優れた薬剤は常に待望されており、本発明は、これに応えんとするものである。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らは次式(Ⅰ)



(Ⅰ)

で示されるバクトボリン(Bactebolin)が自己免疫疾患予防治療効果を有することを見出した。

本発明に使用するバクトボリンはシュードモナス(Pseudomonas)属に属する細菌によつて生産さ

れる既知化合物で抗菌活性及び抗腫瘍活性を有していることも知られている(特開昭56-22777号公報)が、本発明は予想外にもバクトポリンが自己免疫疾患予防治療効果を見出したことに基づいている。バクトポリン(以下、本物質という)の有する自己免疫疾患予防治療効果は後に記した動物実験により具体的に説明される。このような効果を有する本物質は多発性硬化症、急性散在性脊髄症、膠原病などの自己免疫疾患の予防治療薬として有用である。本物質の急性毒性は、特開昭56-22777号公報によれば6.25~12.5mg/kg(マウス、静注)である。

本発明で用いるバクトポリンは、例えば参考例1、2に記した方法で製造することができ、自己免疫疾患予防治療薬として用いるには遊離塩基のまま又は非毒性の鹽との塩の形で用いる。

バクトポリンを有効成分とする本剤は、筋注、静注などの注射剤、カプセル剤、錠剤、顆粒剤、散剤、液剤などの経口剤あるいは軟膏剤、患部投与剤などの外用剤の形で製剤できる。バクトポリ

ンの投与量は、投与経路、剤型、症状などにより変動するが、成人/日量1~1000mgの範囲で選択するのが好ましい。

バクトポリンを製剤するには、通常の方法で製剤化され、本物質に悪影響を与えない限り、製薬技術で知られる種々の成分を配合することができ、注射剤として製剤するには、本物質を注射用蒸留水あるいは生理食塩水に溶解し、必要に応じて安定化剤、分散剤、無痛化剤などを加え注射用アンプルに充填するか、あるいはバイアルビン中で凍結乾燥し、投与時に注射用蒸留水あるいは生理食塩水に溶解して用いるようにすることができる。経口剤として製剤するには、本物質に賦形剤、安定剤、防腐剤、分散剤、などを添加し適当な剤型に製剤する。また、外用剤とするには、本物質を、基剤、安定剤、防腐剤、界面活性剤などを加え適当な剤型に製剤する。

次にバクトポリンの精製法による製造例を参考例に示す。

参考例1

収率68.0%。

参考例2

実施例1で得られた粗粉末13.4gを20mlの水に溶かし、アンバーライトCG-50Ⅱ型(NH₄⁺とH⁺を7:3混合)600mlをつめた塔(内径33mm)にかけ、続いて水で展開し、17mlずつ分画した。分画137-280を合して減圧濃縮乾燥し、1.7gの淡黄色粉末(4890/mg)を得た。収率91.1%。

さらに、この粉末を4mlの水に溶かし、再びアンバーライトCG-50Ⅰ型(NH₄⁺とH⁺7:3混合)100mlの塔(内径14mm)にかけ、水で展開し、14mlずつ分画した。分画31-48を合して減圧濃縮乾燥し、940mgのバクトポリンの白色粉末(7190/mg)を得た。収率77.3%。

次に本発明の薬剤の製剤例を示す。

製剤例1

1バイアル中にバクトポリン100(力価)を含むよう無菌的に分注した。

寒天斜面培地に培養したシユードモナスB M G / 3-A7株(F B B M - P 5083)を、マートス1.5g、酵母エキス0.3g、N2-アミン(A型、フムコ・シエフィールド化学製)1.0g、食塩0.3gからなる液体培地(pH7.4)110mlを含む500ml容三角フラスコに接種し、27℃で24時間、回転振盪機(毎分180回転)上で培養して種培養液を得た。

次に上記と同じ液体培地15gを含む500ml容のステンレス・スチール製ジャー培養器に種培養液(110ml)を接種し、27℃で40時間培養した(攪拌:毎分250回転、通気量毎分15l)。ジャー培養器2基分の培養液を合して遠心分離機(毎分10000回転)で菌体を除去し、上清液276(520/ml)を得た。これを、アンバーライトXAD-2の1.5gを充填した塔(内径65mm)にかけ、55の水で洗浄後、50%メタノール水で溶出し、17.3mlずつ分画した。分画53-299を合して減圧濃縮乾燥し、バクトポリンの粗粉末13.4g(710/mg)を得た。

製剤例2

バクトポリン 10部
 乳糖 60部
 ステアリン酸マグネシウム 5部
 これらを均一に混合し100mg(力価)/カプセルになるようにカプセルに充填した。

製剤例3

オリーブ油 160部
 ポリオキシエチレンラウリルエーテル 10部
 ヘキサメタリン酸ナトリウム 5部
 からなる均一な基剤に、バクトポリンの50部を加え均一に混合し50mg(力価)/カプセルになるよう直腸投与用ソフトカプセルに充填した。
 [発明の効果]

実験的アレルギー性脳脊髄炎(Experimental allergic encephalomyelitis, EAE)は中枢神経髄鞘抗原感作により惹起される自己免疫性脳脊髄炎で、多発性硬化症(multiple sclerosis)の良い動物モデルと考えられている(Paterson, P.Y.,

抑制し、EAEの誘導期に対して抑制的に働くことが示された(後記の表2参照)。

表1

EAEの臨床的症狀におけるバクトポリンの効果(誘導期の処置)

供試化合物	投与量 (mg/kg)	投与期間	EAEの発症 (発症動物数/ 試験動物数)	重症度* (\pm SD)
対照(無投与)	—		5/5	10.2 \pm 1.9
バクトポリン	0.5	1-8日目	0/5	0 \pm 0

* 免疫後16日間観察し、さらに病理観察を行った。

表2

組織学的EAEに対するバクトポリンの効果(誘導期の処置)

供試化合物	供試動物数	組織学的スコア* (\pm SD)
対照(無投与)	6	5.0 \pm 0.0
バクトポリン	5	0.5 \pm 0.6

* 脊髄、脳を含む6ヶ所の平均値。

"Autoimmunity: Genetic, Immunologic,

Virologic and Clinical Aspects." Academic Press, New York. (1977) 及び

Alvord, E.C., Jr., Kies, M.W., and Suckling, A.J., "Experimental Allergic Encephalomyelitis - A Useful Model for Multiple Sclerosis." Alan R. Liss, New York. (1984)]。

バクトポリンの有する自己免疫疾患予防治療効果は以下の試験例によつて説明される。

試験例1 ラット急性実験的自己免疫性脳脊髄炎(EAE)の誘導期の抑制効果

ミエリン塩基性タンパク/フロインド完全アジュバンド(MBP/CFA)感作動物(ラット)に、免疫の翌日(day1)からday8まで、0.5mg/kgのバクトポリンを連日投与した。この投与期間はおよそEAEの誘導期に相当する。その結果、対照ラットは観察期間中に全例がEAEを発症したのに対し、バクトポリン投与群では1例も発症しなかつた(後記の表1参照)。

また、バクトポリンは組織学的EAEも著明に

試験例2 EAEの効果期の抑制効果

主としてEAEの効果期に相当すると思われる期間(day8~14)、MBP/CFA免疫動物をバクトポリンを投与して、その効果をみた。バクトポリンは本実験でも、著明にEAEの発症を抑制した(後記の表3参照)。

また、バクトポリンをDay8-14の期間投与すると、組織学的な病変も著明に抑制した(後記の表4参照)。

表3

EAEの臨床的症狀におけるバクトポリンの効果(効果期(免疫後第8~14日)の処置)

供試化合物	投与量 (mg/kg)	EAEの発症(発症動物 数/試験動物数)	重症度* (\pm SD)
対照(無投与)	—	5/5	15.8 \pm 3.0
バクトポリン	0.5	0/5	0 \pm 0

* 15日目に動物を組織学的検時に付した。

表 4

組織学的 E A E におけるバクトボリンの効果 (効果期の処置)

供試化合物	供試動物数	組織学的スコア* (±SD)
対照 (無投与)	5	2.4 ± 0.5
バクトボリン	5	0.1 ± 0.1

* 免疫後 1/5 日間組織学的検討を行った。

試験例 3 E A E 発症後の抑制効果

E A E が発症してからバクトボリンを投与しても治療効果があるかどうか検討した。E A E 発症当日よりバクトボリンの投与を開始した結果、罹病期間にはあまり影響がなかったが、マヒスコアは有意に抑制された (下記の表 5 参照)。

表 6

受身型 E A E に対するバクトボリンの効果

供試化合物	投与量 (0.5mg/kg)	E A E の発症	重症度 (±SD)
対照 (無投与)	—	2/2	9.5 ± 0.5
バクトボリン	0.5	0/2	0 ± 0

試験例 5 リンパ球増殖反応に対する抑制効果

対照およびバクトボリン投与ラットの Day 11 (感作 11 日目) のリンパ節細胞を用いて、抗原特異的増殖反応と Con A 応答を測定した。バクトボリン投与群のリンパ節細胞では抗原特異的増殖反応がみられず、また Con A 応答も抑制されていた (下記の表 7 参照)。

表 5

E A E 発症後のバクトボリンの効果 *

供試化合物	投与量 (mg/kg)	罹病期間 (日数 ± SD)	重症度 (±SD)
対照 (無投与)	—	5.0 ± 1.1	11.2 ± 1.9
バクトボリン	0.5	4.6 ± 1.0	4.6 ± 1.3

* 最初の症状が認められてから処置 (バクトボリン投与) を開始した (対照群はリン酸バッファーのみを投与した)。

試験例 6 受身型 E A E に対する効果

バクトボリンの E A E 効果期に対する抑制効果をより明確にするために、受身型 E A E に対する抑制効果をみた。バクトボリンは受身型 E A E の発症も著明に抑制した (下記の表 6 参照)。

表 7

リンパ球増殖反応に対するバクトボリンの効果

抗原又は 分裂促進 因子	対照 (無投与) CPM ± SD	バクトボリン CPM ± SD
—	11,927 ± 331	5,838 ± 316
MBP	30,214 ± 3,081	2,507 ± 670
PPD	34,554 ± 2,938	5,315 ± 696
ConA	338,783 ± 6,433	82,371 ± 27,295

以上の試験例で示したごとく、バクトボリンは、E A E の誘導期と効果期の両相を著しく抑制し、予防効果があることが認められた。また、発症後の E A E にもバクトボリンは抑制効果を示して治療効果もあることが認められた。